

セルロースおよびその誘導体の酵素触媒重合による合成

著者	岡本 悦哉
号	1971
発行年	1996
URL	http://hdl.handle.net/10097/7244

氏名

おか もと えつ や

授与学位

岡 本 悦 哉

学位授与年月日

博士(工学)

学位授与の根拠法規

平成9年3月25日

研究科、専攻の名称

学位規則第4条第1項

学位論文題目

東北大学大学院工学研究科(博士課程)材料化学専攻

指導教官

セルロースおよびその誘導体の酵素触媒重合による合成

論文審査委員

東北大学教授 小林 四郎

主査 東北大学教授 小林 四郎 東北大学教授 西野 徳三

東北大学教授 宮下 徳治

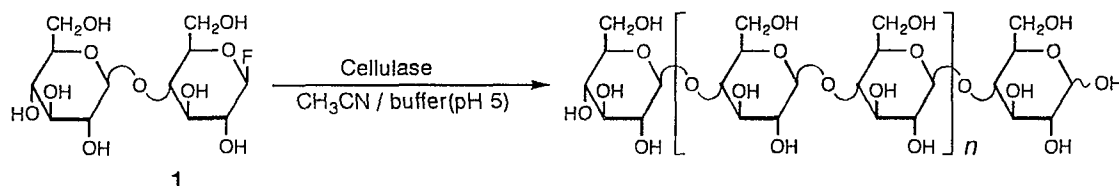
論文内容要旨

第1章 序論

セルロースは自然界に最も多量に存在する高分子であり、紙、繊維などとして広く用いられている。また、その誘導体も数が多く、材料化学等の幅広い分野で利用されている。

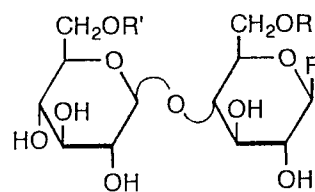
既に我々の研究室では、フッ化 β -セロビオシル 1 を基質モノマーとする酵素触媒重合によって、合成セルロースが得られることを見い出している (Scheme 1)。本研究では、この重合反応で用いているセルラーゼ触媒の基質特異性に着目し、第2章では6位を置換したセロビオース誘導体モノマー類の合成と重合反応について検討した。第3章ではセルロース合成活性を有するセルラーゼ遺伝子 (*egl2*) のクローニングについて試みた。

Scheme 1



第2章 置換セロビオース誘導体モノマーの合成と酵素触媒重合挙動

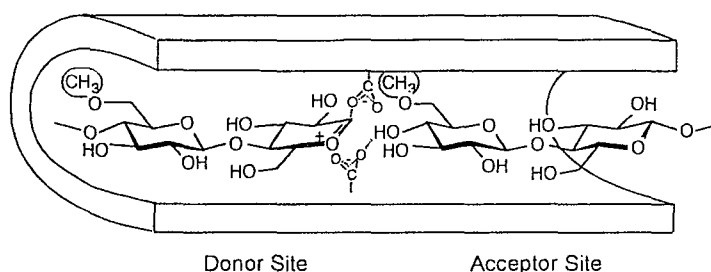
フッ化 β -セロビオシル 1 の水酸基の一部に置換基を導入した新たな基質モノマーを重合させることができれば、置換基の位置が規定された構造明確なセルロース誘導体の合成が可能になると予想される。そこで、フッ化 β -セロビオシルの2種類の6位水酸基に着目し、6,6'-ジ- O -メチル体 2、6'- O -メチル体 3、6- O -メチル体 4 の各々について合成ルートを設定し、それに従って3種類の新規モノマーを合成した。これらの O -メチル誘導体は、セルラーゼあるいは重合活性を担うエンドグルカナーゼ p38 によって、還元末端1位の加水分解がおこることから、基質として酵素に取り込まれていることが明らかとなった。この結果を踏まえて、有機溶媒/酢酸緩衝液混合系中で各モノマーのエンドグルカナーゼ p38 による重合反応を試みたところ、



- 2 R = R' = Me,
- 3 R = H, R' = Me
- 4 R = Me, R' = H

6,6'-ジ-O-メチル体、6'-O-メチル体を用いた場合には、基質の消費が遅く、生成物も二量体程度であったが、6-O-メチル体では速やかに重合反応が進行し、生成物が反応系内に沈殿として生じることがわかった。水不溶性の多糖も得られたが、GPC等の結果から、重合度は20糖程度のものであると考えられる。このようにモノマー **3** と **4** とで重合反応性が異なるのは、モノマーの一级水酸基上のメチル基と、セルラーゼの活性サイトを形成するアミノ酸残基との立体的相互作用に差が生じるためと考えられる (Figure 1)。すなわち、基質がセルラーゼに取り込まれる際には、非還元末端6'位水酸基の側が酵素と接するため、**3** では基質として取り込まれるものの、連鎖的な重合反応は進まないものと推察される。

3 6'-O-メチル体



4 6-O-メチル体

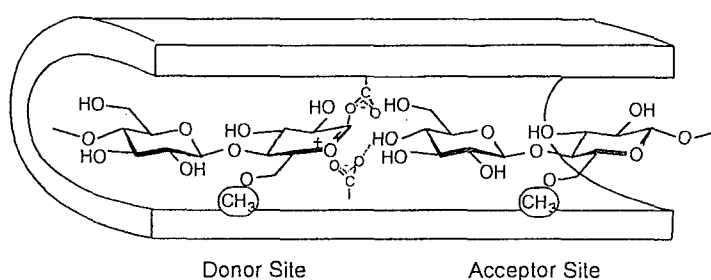


Figure 1 エンドグルカナーゼ p38 活性サイト付近のモデル

第3章 セルロース合成活性を有するセルラーゼ触媒の遺伝子クローニングを用いる調製の試み

これまで、我々がセルロース合成に用いてきたセルラーゼ (ONozuka R-10、*Trichoderma viride* 由来) は粗酵素であり、極めて多数のタンパク質から成り立っている。そこで、この中から重合活性を担っている成分の単離、同定をアメリカのグループとの共同研究により行った。その結果、重合活性を有する成分の1つ p38 は *Trichoderma reesei* 由来のエンドグルカナーゼ EG II と高い相同性があることがわかった。次に、この成分の遺伝子クローニングについて検討した。*T. viride* のゲノムDNAを鋳型としてPCRを行ったところ、*T. reesei* のEG II とほぼ完全に一致する遺伝子断片を得ることができた。この断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションによる解析を行ったところ、*T. viride* のゲノムには他に相同性のある遺伝子は見出せなかった。そこで *T. viride* のゲノムDNAライブラリーを作製し、この中からコロニーハイブリダイゼーションの手法を用いて目的とするクローンを拾い、目的とする *egl2* 遺伝子の全配列を読んだ結果、アミノ酸配列で *T. reesei* のEG II と95%の相同性があることが明らかとなった。

第4章 総括

審査結果の要旨

半世紀にわたり懸案であったセルロースの人工合成が本研究室で初めて達成されて以来数年になる。本論文は、その合成反応を応用し、これまでの手法では不可能であったセルロース誘導体を合成することを主目的とする結果、および触媒作用を担う酵素の活性点についての知見を得るため重合活性を有するセルラーゼ酵素の精製単離と活性酵素部の遺伝子クローニングを用いた調製を試みた結果をまとめたもので、全文4章よりなる。

第1章は序論である。

第2章では、非天然の構造明確なセルロース誘導体である6位交互メチル化セルロースを合成した。重合モノマーとして6位メチル及び6'位メチル化フッ化セロビオシルを合成した。セルロースの重合に活性の大きいエンドグルカナーゼp38画分（分子量38,000）を精製単離した。双方のモノマー共p38に認識され重合が進行することが確認された。生成ポリマーの分子量は6位メチル化体からの方が大きいことが明らかにされた。その理由として、半円筒状の活性サイトに認識される際ドナー側とアクセプター側の位置関係におけるメチル基の立体障害のためとされた。比較のため6位、6'位共にメチル化されたモノマーを合成したが、重合は起こらなかった。これらの結果はモノマーの段階で置換基を望む位置に導入し重合させることにより従来法では不可能なセルロース誘導体を合成できることを示したものであり、同時に酵素触媒活性点の構造に対する重要な知見を与えている。

第3章では、機能性高分子の立場から試験管内で合成した酵素蛋白質が、実際に前章で使用した*T. viride* 由来 p38画分のように酵素機能を発現するかどうかを検証するため、*T. reesei* 由来のセルラーゼEGIIと相同性のあるエンドグルカナーゼp38のクローニングについて検討している。すでに明らかにされているp38のアミノ酸配列を用いてクローニングを行い、PCR産物を得た結果、遺伝子配列からEGIIの一部であるeg/2遺伝子が重合活性をもつ蛋白質生産に関連することが明らかとなった。

第4章は総括である。

以上要するに本論文は、従来法では得られない構造明確なセルロース誘導体を合成する手法を開拓し、*T. viride*のeg/2の遺伝子配列を明らかにすることによって合成蛋白質が重合触媒となる可能性を示したもので、高分子合成化学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士（工学）の学位論文として合格と認める。